



LAPORAN PENELITIAN
RISET FUNDAMENTAL
TAHUN ANGGARAN 2006

**POTENSI DAN MEKANISME KERJA ISOFLAVONOID
UNTUK PROTEKSI SEL ENDOTHELIUM PADA
HIPERKOLESTEROLEMIA**

Peneliti:

**drh. Sri Agus Sudjarwo, Ph.D.
dr. Widajat S., Sp.FK.**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan,
Departemen Pendidikan Nasional,
sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian
Nomor: 318/SP3/PP/DP2M/II/2006
Tanggal 1 Pebruari 2006
Nomor Urut 14

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2006



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

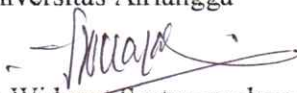
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : infolemlit@unair.ac.id - http://lppm.unair.ac.id

IDENTITAS DAN PENGESAHAN

LAPORAN AKHIR HASIL FUNDAMENTAL RISET

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. a. Judul Penelitian | : Potensi Dan Mekanisme Kerja Isoflavonoid Untuk Proteksi Sel Endothelium Pada Hiperkholesterolemia |
| b. Macam Penelitian | : (v) Fundamental () Terapan () Pengembangan |
| c. Kategori Penelitian | : (v) I () II () III |
| 2. Kepala Proyek | |
| a. Nama | : drh. Sri Agus Sudjarwo, Ph.D |
| b. Jenis Kelamin | : Laki-laki |
| c. Pangkat/Golongan dan NIP | : Penata/IIIc/131406098 |
| d. Jabatan Sekarang | : Lektor |
| e. Fakultas/Puslit/Jurusan | : Fakultas Kedokteran Hewan |
| f. Univ/Ins/Akademi | : Universitas Airlangga |
| g. Bidang Ilmu yang diteliti | : Farmakologi |
| 3. Jumlah Tim Peneliti | : 2 orang |
| 4. Lokasi Penelitian | : Lab. Farmakologi FK UNAIR |
| 5. Kerjasama dengan Instansi lain | |
| a. Nama Instansi | : Fakultas Kedokteran UNAIR |
| b. Alamat | : Jl. Prof. Moestopo 47 Surabaya |
| 5. Jangka Waktu Penelitian | : 8 bulan |
| 6. Biaya yang Diperlukan | : Rp 20.000.000 |

Mengetahui
Ketua Pusat Penelitian Obat Tradisional
Universitas Airlangga

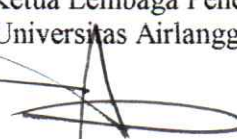

dr. Widayat Sastrowardoyo, SpFK
NIP. 130 743 645

Surabaya, 20 Oktober 2006
Ketua Peneliti


drh. Sri Agus Sudjarwo, Ph.D
NIP 131 406 098



Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga


Prof. Dr. H. Sarmanu MS
NIP 130 701 125

ABSTRACT :**POTENCY AND MECHANISM OF ACTION OF ISOFLAVONOID FOR
PROTECTIVE ON ENDOTHELIAL CELL IN HYPERCHOLESTEROLEMIA**

Sri Agus Sudjarwo, *Widayat Sastrowardoyo
Department of Pharmacology, Faculty of veterinary Medicine and
***Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya**

Protective effect of isoflavonoid on endothelial cell were studied in cholesterol-fed rabbits. The cholesterol-rich diet markedly increased Malondialdehyde (MDA) in the plasma as reflected by Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS), decreased cGMP and decreased endothelium-dependent vascular relaxations to acetylcholine compared to vessels from normal rabbits. In cholesterol-fed rabbits, Isoflavonoid treatment decreased MDA in plasma production, increased cGMP and increased endothelium-dependent relaxations to acetylcholine.

These results suggest that dietary treatment of rabbits with isoflavonoid may prevent superoxide anion (O_2^-) induced inactivation of endothelium-dependent relaxing factor (EDRF), improve the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the aortic blood vessels and increase cyclic GMP content in aortic cholesterol-fed rabbits.

RINGKASAN :

**POTENSI DAN MEKANISME KERJA ISOFLAVONOID UNTUK PROTEKSI
SEL ENDOTHELIUM PADA HIPERKHOLESTEROLEMIA.**

**Sri Agus Sudjarwo dan *Widayat Sastrowardoyo
Fakultas Kedokteran Hewan dan *Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga, Surabaya**

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk membuktikan efek isoflavonoid dalam menurunkan kadar MDA, meningkatkan pelepasan EDRF dan meningkatkan produksi cGMP pada kelinci hyperkholesterolemia.

Hewan coba kelinci secara acak dibagi menjadi 4 kelompok sebagai berikut :6 ekor kelinci diberi makanan tanpa kolesterol (kontrol negatif), 6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol 2 % (kontrol positif), 6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi isoflavonoid dengan dosis 100 mg/kg BB (perlakuan I) dan 6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi isoflavonoid dengan dosis 200 mg/kg BB (perlakuan II). Setelah 8 minggu dari perlakuan, pada semua hewan percobaan diambil darahnya untuk diperiksa kadar MDA (*Malondialdehyde*). Selanjutnya semua hewan percobaan dibunuh dan diambil aortanya untuk diperiksa EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) yang dilepaskan dari sel endothelium dan juga diperiksa kadar cGMP nya..

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Data dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Analisa Varian yang dilanjutkan dengan uji LSD..

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian isoflavonoid dosis 200 mg/Kg BB dapat menurunkan kadar MDA dalam plasma, meningkatkan pelepasan EDRF dan meningkatkan produksi cGMP pada kelinci hyperkholesterolemia.

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan untuk menggali lebih dalam potensi isoflavonoid untuk proteksi sel endothelium seperti mengukur kadar Nitrik Oksid nya.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat-Nya, sehingga penelitian tentang potensi isoflavonoid untuk proteksi sel endothelium pada hyperkholesterolemia dapat terselesaikan.

Gangguan kardiovaskuler merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia. Dengan semakin mahalnya harga obat dan semakin meningkatnya gangguan kardiovaskuler ini maka pemerintah telah menggalakan penelitian untuk mencari obat baru sebagai obat alternatif untuk menunjang obat yang sudah ada, Oleh karena itu penulis tertarik untuk meneliti isoflavonoid yang berasal dari tanaman seperti kedelai yang banyak tumbuh di daerah tropis seperti di Indonesia untuk gangguan kardiovaskuler yaitu untuk proteksi sel endothelium pada hyperkholesterolemia. Dari penelitian ini diharapkan dapat ditemukan obat baru yang murah, poten dan mudah didapatkan sehingga hasilnya dapat berguna bagi masyarakat banyak.

Hasil penelitian ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Untuk itu penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada Rektor UNAIR, Dekan Fakultas Kedokteran UNAIR dan Ketua Lembaga Penelitian UNAIR serta kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini sehingga dapat terselesaikan..

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian, semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan informasi kepada masyarakat banyak,

Surabaya, Oktober 2006

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
ABSTRACT	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB. I PENDAHULUAN	1
BAB. II. TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT	13
BAB IV. METODE PENELITIAN	14
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	29

DAFTAR TABEL

TABEL :	Halaman
1. Kandungan genestein dan daedzein pada berbagai bahan	4
2. Rata-rata dan simpangan baku kadar MDA dari berbagai kelompok	17
3. Rata-rata dan simpangan baku relaksasi aorta dari asetilkholin pada berbagai kelompok	20
4. Rata-rata dan simpangan baku produksi cGMP dari berbagai kelompok	22

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR:	Halaman
1. Mekanisme Relaksasi Otot Polos Pembuluh Darah dari Asetilkholin, Endothelin, Bradikinin dan Histamin	11
2. Kadar MDA Plasma Kelinci dari berbagai kelompok	19
3. Relaksasi Aorta dari Asetilkholin pada berbagai kelompok	21
4. Kadar siklik GMP Kelinci dari berbagai kelompok	23

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN :	Halaman
1. Data Kadar MDA Dari Berbagai Kelompok	29
2. Analisis Statistik Kadar MDA Dari Berbagai Kelompok	30
3. Data Relaksasi Asetilkholin Dari Berbagai Kelompok	31
4. Analisis Statistik Relaksasi Asetilkholin Dari Berbagai Kelompok	32
5. Data Kadar c GMP Dari Berbagai Kelompok	36
6. Analisis Statistik Kadar c GMP Dari Berbagai Kelompok	37

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang Masalah

Di Indonesia, penyakit kardiovaskuler (jantung koroner dan pembuluh darah) merupakan salah satu penyebab kematian yang terbesar. Telah dilaporkan bahwa ada beberapa faktor resiko terhadap gangguan kardiovaskuler ini antara lain hiperkolesterolemia, hipertensi, diabetes, kurang olah raga dan kegemukan (Steinberg and Witztum, 1990).

Dari beberapa faktor di atas, hiperkolesterolemia ternyata paling berperan terhadap gangguan kardiovaskuler, terutama untuk terjadinya aterosklerosis. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa gangguan kardiovaskuler pada manusia dan keparahan aterosklerosis pada hewan coba berhubungan dengan meningkatnya kadar kolesterol (Miller, 1990; Cooke *et al.*, 1992).

Peningkatan kadar kolesterol dalam darah (hiperkolesterolemia) dapat menyebabkan kerusakan sel endothelium (Dusting *et al.*, 1999). Sel endothelium mempunyai peran yang sangat penting dalam mengatur tonus otot polos pembuluh darah yaitu dengan melepaskan relaksing faktor (EDRF / *Endothelium Derived Relaxing Factor*) dan kontraktng faktor (EDCF / *Endothelium Derived Contracting Factor*) sehingga dapat dipertahankan keadaan tekanan darah yang normal (Furchgott and Zawadzki, 1980). Disamping itu endothelium juga berperan pada migrasi dan pertumbuhan dari sel otot polos pembuluh darah, menghambat proses koagulasi darah dan merangsang disolusi bekuan darah yang telah terbentuk pada lumen pembuluh darah, dan mengatur adesi dan migrasi sel-sel radang pada dinding pembuluh darah (Inoue *et al.*, 1992).

Kerusakan sel endothelium pada keadaan hiperkolesterolemia dapat terjadi karena adanya peningkatan pembentukan radikal bebas superoksida, yang kemudian dapat menyebabkan oksidasi LDL sehingga akan terbentuk gugus hidroksil pada sel endothelium dan otot polos pembuluh darah (Ohara *et al.*, 1992; Inoue and Nishida, 1998). Hidroksil radikal ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang banyak terdapat pada membran sel sehingga dapat menimbulkan reaksi lipid peroksidasi yang akan menghasilkan lipid peroksid. Oksidasi

LDL dan lipid peroksid yang terbentuk akan merusak sel endothelium sehingga dapat menghambat pelepasan EDRF dan menurunkan produksi siklik GMP (Mei and Chen, 1994; Boger and Frolich, 1997). Kerusakan sel endothelium ini dapat dihambat oleh preparat antioksidan seperti Vitamin E dan Vitamin C (Pierdomenica *et al.*, 1998; Mahfouz *et al.*, 1997), dan Probukol (Simon *et al.*, 1993; Inoue and Nishida, 1998). Karena mahalnya preparat antioksidan ini dan dengan semakin meningkatnya kasus hiperkolesterolemia yang dapat menyebabkan kerusakan sel endothelium sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kardiovaskuler seperti atherosklerosis, gagal jantung dan hipertensi yang merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia, maka perlu upaya mencari dan mengembangkan obat baru yang potent, murah, aman dan mudah didapatkan terutama yang berasal dari tanaman sebagai obat alternatif.

Belum terjangkaunya obat modern oleh seluruh lapisan masyarakat, maka kemungkinan pemanfaatan obat tradisional perlu dijajaki untuk menunjang pemakaian obat modern, dengan syarat bahwa obat tradisional tersebut terbukti berkhasiat dan aman. Pemerintah telah mengambil kebijaksanaan dalam rangka pembudidayaan tumbuhan obat tradisional, baik dalam bentuk jamu, fitofarmaka ataupun sebagai bahan obat alam yang berasal dari tanaman.

Telah dilaporkan bahwa isoflavonoid yang berasal dari tanaman kedelai mempunyai efek antioksidan yang kuat (Wei *et al.*, 1995; Hertog *et al.*, 1993), dapat menghambat proses lipid peroksidasi (Wei *et al.*, 1995), menurunkan kadar LDL (Howes *et al.*, 2000), menurunkan kadar kolesterol (Wangen *et al.*, 2001), meningkatkan kadar HDL (Teixeira *et al.*, 2000) dan menurunkan kadar trigliserida (Merz-Demlow *et al.*, 2000).

Oleh karena Isoflavonoid mempunyai efek antioksidan yang kuat dan dapat menurunkan kolesterol darah maka perlu dilakukan penelitian mengenai potensi isoflavonoid untuk proteksi sel endothelium pada hiperkolesterolemia, sehingga dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diperoleh suatu obat yang berasal dari tumbuhan sebagai obat alternatif yang efektif, murah, aman dan mudah didapatkan yang dapat digunakan untuk mencegah kerusakan sel endothelium pada aterosklerosis hiperkolesterolemia.

I.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- a. Apakah isoflavonoid dapat menghambat peningkatan kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada kelinci hiperkolesterolemia ?
- b. Apakah isoflavonoid dapat meningkatkan pelepasan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) dari sel endothelium pada kelinci hiperkolesterolemia ?
- c. Apakah isoflavonoid dapat meningkatkan produksi cGMP pada kelinci hiperkolesterolemia ?

I.3. Hipotesis :

- a. Isoflavonoid dapat menghambat peningkatan kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada kelinci hiperkolesterolemia
- b. Isoflavonoid dapat meningkatkan pelepasan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) dari sel endothelium pada kelinci hiperkolesterolemia
- c. Isoflavonoid dapat meningkatkan produksi cGMP pada kelinci hiperkolesterolemia

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Tinjauan Tentang Isoflavonoid

Isoflavonoid merupakan sub famili dari flavonoid. Telah dilaporkan lebih kurang ada 1000 jenis isoflavonoid, namun yang mempunyai aktivitas biologis yaitu formononetin, biochanin, daidzein dan genestein (Kelly *et al.*, 1997).

Isoflavonoid terdapat dalam jumlah yang besar pada family Leguminosae seperti kacang kedelai dan produk olahannya seperti tahu, tempe, susu kedelai, dan semanggi merah (Knight., 1999) seperti terlihat pada tabel 1 .

Tabel 1. Kandungan Genestein dan Daidzein pada berbagai bahan (mg/100mg berat kering)

No	Jenis Makanan	Genestein	Daidzein
1	Green soybean	72.9	54.6
2	Tofu	16.2	14.6
3	Fermented soy	32	27.3
4	Roasted soybean	86.9	56.3
5	Soy noodle (dry)	3.7	0.9
6	Red clover	4	3.5
7	Tepung kedelai	81	22.6

(Knight *et al.*, 1999)

Tingginya kadar isoflavonoid (genestein dan daedzein) dalam kacang kedelai membuat tanaman ini merupakan salah satu bahan makanan yang dapat digunakan untuk mencegah terjadinya penyakit kardiovaskuler (Kelly *et al.*, 1997).

II.1.1 Efek antioksidan dari isoflavonoid

Isoflavonoid mempunyai efek antioksidan yang lebih kuat bila dibandingkan dengan senyawa phenol lainnya seperti Vitamin E (Wei *et al.*, 1995). Sebagai antioksidan, isoflavonoid bekerja dengan cara memutus rantai pada peroksidasi PUFA yaitu dengan

menangkap radikal peroksid. Selain itu isoflavonoid dapat mencegah terjadinya lipid peroksidasi dengan cara menangkap radikal hidroksil. Juga dilaporkan bahwa isoflavonoid dapat meningkatkan enzim antioksidan internal seperti glutathione pada kulit dan usus dan dapat menghambat pembentukan hydrogen peroksida pada semua sel (Frenkel, 1996)

II.1.2 Efek isoflavonoid pada sistem kardiovaskuler

Telah dilaporkan bahwa isoflavonoid dapat digunakan untuk mencegah terjadinya atherosclerosis dan penyakit jantung koroner (Anthony et al., 1996; Chin-Dusting et al., 2001). Penelitian pada hewan coba mencit, kelinci dan primata menunjukkan bahwa isoflavonoid dapat menurunkan total kolesterol dan LDL, meningkatkan HDL, menghambat lipid peroksidasi dan menghambat platelet agregasi (Tikkanen et al., 2000; Kirk et al., 1998; Anthony et al., 1996)

II.2. Tinjauan Tentang Endothelium

Sel endothelium mempunyai peran yang sangat penting dalam mengatur tonus otot polos pembuluh darah dan fungsi organ. Karena letaknya maka endothelium bukan hanya mengatur fungsi dinding pembuluh darah dan jaringan sekitarnya tetapi juga pada aktivitas sirkulasi sel dan konsentrasi dari mediator dalam sirkulasi seperti endothelin, angiotensin, bradikinin, serotonin, katekolamin dan adenosin. Sel endothelium dapat melepaskan Prostasiklin dan Nitrik Oksid sehingga dapat terjadi relaksasi otot polos pembuluh darah. Endothelium berperan untuk proteksi dan mempertahankan fungsi fisiologi dari dinding pembuluh darah yaitu menghambat kontraksi, dan migrasi serta pertumbuhan dari sel otot polos pembuluh darah. Endothelium juga aktif menghambat proses koagulasi dan menyebabkan fibrinolisis. Endothelium dapat mencegah terjadinya migrasi dari sel radang ke dalam dinding pembuluh darah (Flavahan, 1992).

II.2.1 Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF)

Pada tahun 1980, Furchgott dan Zawadzki melaporkan bahwa relaksasi otot polos pembuluh darah yang disebabkan oleh asetilkholin tergantung adanya endothelium. Hal ini membuktikan bahwa endothelium dapat melepaskan mediator vasoaktif yang diberi nama EDRF. EDRF mempunyai waktu paruh hanya beberapa detik dan telah dilaporkan bahwa

EDRF ini adalah NO (Nitrik Oksid) karena EDRF mempunyai struktur dan sifat kimia serta aktivitas biologis yang sama dengan NO (Sudjarwo *et al.*, 1992). Relaksasi yang tergantung adanya endothelium dapat terlihat pada vena, arteri dan pembuluh darah kecil yang terjadi akibat adanya berbagai rangsangan seperti asetilkolin, thrombin, endothelin, substansi P, histamin, kalsium ionofore A23187 dan bradikinin. Rangsangan lain dapat berupa hipoksia, meningkatnya aliran darah dan rangsangan listrik.

Pelepasan EDRF dari sel endothelium akan mengaktifkan guanil siklase sehingga dapat menyebabkan peningkatan produksi siklik GMP yang dapat menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah. Disamping itu EDRF juga mempunyai efek langsung pada kalium channel sehingga dapat menyebabkan hiperpolarisasi. Relaksasi otot polos akibat pelepasan EDRF ini dapat dihambat oleh metilen blue (penghambat guanil siklase), hemoglobin (pengikat EDRF) dan L-arginin analog (penghambat pembentukan NO) (Karaki and Sudjarwo, 1993).

EDRF dapat menghambat oksidasi LDL sebagai mediator aterogenik. Kemampuan kerja EDRF untuk menghambat terjadinya lesi aterosklerosis ini ditunjukkan oleh kemampuan L-arginin yang merupakan prekursor EDRF untuk menghambat terjadinya lesi (Flavahan, 1992; Evan and Brueddorfer, 1992).

EDRF yang dilepaskan dari sel endothelium, disintesis dari L-arginin dengan bantuan enzim NO sintase (NOS). Pada sintesis ini L-arginin mula-mula akan dihidrolisis menjadi *N-hidroksil-L-arginin* dan kemudian akan teroksidasi dan menghasilkan NO dan sitrulin (Boger and Frolich, 1997).

II.2.2 Peran endothelium pada gangguan kardiovaskuler

EDRF yang dilepaskan oleh sel endothelium mempunyai peran penting dalam mengatur tonus vaskuler dan menjaga aliran darah koroner selama ada peningkatan kebutuhan metabolik. Gangguan pelepasan EDRF dari sel endothelium dapat terjadi karena adanya hambatan pembentukan EDRF, adanya degradasi sel endothelium, penurunan sensitivitas pada pembentukan NO atau gabungan dari faktor tersebut. Gangguan ini dapat menimbulkan keadaan patologi yang sering disebut disfungsi endothel (Dusting and Dart, 1999).

Secara anatomi, letak sel endothelium sangat strategis yaitu antara aliran darah (lumen) dan otot polos vaskuler (lapisan media dinding pembuluh darah) sehingga sel

endothelium dapat berfungsi sebagai target organ dan modulator dari tekanan darah. Gangguan fungsi endothelium seperti menurunnya pelepasan EDRF atau meningkatnya pelepasan EDCF merupakan faktor penyebab terjadinya kondisi patologi yang diantaranya adalah gangguan kardiovaskuler (Drexler, 1996) seperti berikut dibawah ini:

a. Hipertensi

Sel endothelium sangat berperan terhadap meningkatnya tekanan darah. Pengaruh fisik seperti shear stress, aliran darah yang meningkat, kelenturan dan tekanan dapat menyebabkan gangguan fungsi dari sel endothelium. Perubahan morfologi dan gangguan fungsi dari sel endothelium ini sangat berhubungan erat dengan terjadinya hipertensi. Pada hipertensi, sel endothelium dalam aliran darah jumlahnya meningkat, ada penonjolan dinding pembuluh darah kedalam lumen, ada peningkatan fibrin pada ruang subintimal dan terdapat interaksi antara platelet dan monosit dengan sel endothelium. Keseimbangan antara mediator yang dilepaskan oleh sel endothelium yang dapat menyebabkan relaksasi dengan mediator yang dapat menyebabkan kontraksi sangat mempengaruhi terjadinya gangguan kardiovaskuler, terutama hipertensi.

b. Hiperkolesterolemia dan Aterosklerosis

Pada hiperkolesterolemia dan aterosklerosis dapat terjadi kerusakan sel endothelium. Hal ini karena adanya peningkatan pembentukan radikal bebas superoksida, yang kemudian dapat menyebabkan oksidasi LDL sehingga akan terbentuk gugus hidroksil pada sel endothelium dan otot polos pembuluh darah. Hidroksil radikal ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang banyak terdapat pada membran sel sehingga dapat menimbulkan reaksi lipid peroksidasi yang akan menghasilkan lipid peroksid (Inoue and Nishida, 1998). Oksidasi LDL dan lipid peroksid yang terbentuk akan merusak sel endothelium sehingga dapat menghambat pelepasan EDRF dan menurunkan produksi cyclic GMP (Mei and Chen, 1994; Boger and Frolich, 1997).

Pada hiperkolesterolemia dan atherosklerosis, kerusakan endothelium dapat dicegah dengan cara: pengobatan untuk menurunkan kadar kolesterol, konsumsi makanan yang kaya minyak ikan, pemberian L-arginin sebagai prekursor NO dan mencegah degradasi NO melalui inaktivasi radikal bebas superoksida dengan preparat antioksidan dan pemberian superoksida dismutase. Langkah ini penting untuk mencegah terjadinya penyakit kardiovaskuler (Meredith *et al.*, 1993).

II.2.3. Disfungsi sel endothelium

Disfungsi sel endothelium dapat menekan aktifitas EDRF dan hilangnya efek proteksi sehingga dapat mempercepat terjadinya proses aterosklerosis pada hewan percobaan (Flavahan *et al.*, 1991). Hambatan Nitrik Oksid Sintase (NOS) oleh L-NAME dapat mempercepat perkembangan lesi aterosklerosis, sebaliknya pemberian L-arginine yang merupakan prekursor dari EDRF dapat menekan lesi intima (Cooke *et al.*, 1992). Disfungsi sel endothelium seperti diatas dapat terjadi pada aorta kelinci yang di buat menjadi hiperkolesterolemia sehingga dapat menghambat respon dari asetilkolin dan serotonin yang tergantung adanya sel endothelium (Simon *et al.*, 1993).

Disfungsi sel endothelium dapat disebabkan oleh adanya modifikasi LDL dan lipid yang berasal dari lipoprotein yang dapat menghambat relaksasi yang tergantung adanya endothelium dan efek hambatan ini diperantarai oleh *lysophosphatidylcholine* (*lyso-PC*) yang berhubungan dengan partikel oksidasi LDL. Pengaruh hambatan oleh oksidasi LDL ini dapat dihambat oleh HDL. Pada arteri koroner hiperkolesterolemia, *lyso-PC* secara selektif menghambat relaksasi yang tergantung endothelium karena adanya aktivasi Gi-2 protein pada sel endothelium (Inoue *et al.*, 1992).

Lyso-Pc atau oksidasi LDL menghambat peningkatan kalsium intrasel yang ditimbulkan oleh asetilkolin pada sel endothelium aorta kelinci, oleh thrombin atau histamin pada sel endothelium *vena umbilicus* manusia atau oleh bradikinin pada sel endothelium aorta sapi (Miwa *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1992). Efek hambatan ini berhubungan dengan hambatan peningkatan produksi IP3 yang disebabkan oleh agonis. Penelitian selanjutnya jua menunjukkan bahwa efek hambatan dari *lyso-PC* atau oksidasi LDL pada relaksasi yang tergantung endothelium disebabkan oleh adanya hambatan signal transduksi pada sel endothelium. Mekanisme hambatan lipid pada signal transduksi endothelium bisa melibatkan aktivasi dari protein kinase C. Protein kinase C dapat menyebabkan fosforilasi Gi-protein yang mengakibatkan hambatan pada fungsi endothelium. Aktivasi protein kinase C oleh phorbol ester menyebabkan hambatan pada respon endothelium yang tergantung adanya Gi-protein (Flavahan *et al.*, 1992).

Gangguan signal Gi-2 protein pada endothelium bisa mengurangi aktivitas dari EDRF yang dapat terjadi pada proses awal aterosklerosis atau pada pemberian modifikasi lipoprotein pada sel endothelium. Menurunnya aktivitas EDRF akan mengurangi peran proteksi dari endothelium dan selanjutnya bisa mempercepat proses atherosklerosis.

Gangguan signal dari Gi-2 protein bisa juga menyebabkan endothelium secara aktif menimbulkan penyakit.

Gi-2 protein sel endothelium dapat menghambat adenil siklase yang menyebabkan menurunnya kadar siklik AMP pada endothelium. Meningkatnya kadar siklik AMP pada sel endothelium dapat ditimbulkan oleh aktivasi Gs protein (isoproterenol, cholera toxin) atau oleh analog siklik AMP (*dibutyryl cyclic AMP*). Efek proaterogenik diawali oleh adanya gangguan signal Gi-2 protein yang bisa diakibatkan adanya aktivasi yang tergantung siklik AMP dari faktor transkripsi NFkB. Faktor transkripsi ini mempunyai peran yang sangat penting pada respon atherogenik endothelium dan NFkB ini terletak pada faktor yang merangsang koloni makrophage, faktor pertumbuhan sitokin, protein chemotaktik dan pada gene pemacu adesi monosit.

Telah dilaporkan bahwa menurunnya aktivitas EDRF sebagai akibat dari rusaknya sel endothelium yang disebabkan oleh meningkatnya aktivitas superoksid karena adanya lipoprotein atau hiperkolesterolemia (Ohara *et al.*, 1992). Pada hyperkolesterolemia, sel intima dapat menghasilkan superoksid yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan sel normal dan pemberian antioksidan dapat menghambat proses atherosklerosis dan dapat meningkatkan aktivitas EDRF (Simon *et al.*, 1993).

II.3. Tinjauan Tentang Radikal Bebas

Oksidan yang terlibat dalam berbagai proses patologis sebagian besar merupakan oksidan endogen yang terbentuk dalam tubuh kita sendiri, yang disebut sebagai senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen compound/ROC*, *Reactive OxygeSpecies/ROS*). ROS dapat berbentuk radikal seperti radikal hidroksil, radikal peroksil dan superoksid. (Evan and Brueddorfer, 1992)

ROS merupakan oksidan yang sangat kuat yang dapat bereaksi dengan semua senyawa yang dapat melepaskan elektron. Reaksi dari ROS ini yang paling penting adalah terhadap asam lemak khususnya asam lemak tak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang merupakan komponen membran sel, DNA yang merupakan perangkat genetik sel, dan protein yang melaksanakan berbagai peran penting seperti enzim, reseptor, antibodi dan pembentuk matrik ekstrasel serta sitoskeleton.

II.3.1 Efek radikal bebas terhadap asam lemak tak jenuh

Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh jamak. Radikal bebas akan bereaksi dengan asam lemak tak jenuh jamak sehingga dapat terbentuk lipid peroksid yang bersifat toksik terhadap sel dan dapat mengakibatkan kerusakan membran sel (Evan and Bruedorfer, 1992).

II.3.2 Efek radikal bebas terhadap DNA

Radikal hidroksil dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA yang berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan cincin purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tidak terlalu parah, maka masih dapat diperbaiki oleh sistem DNA (DNA repair sistem). Akan tetapi jika kerusakannya terlalu parah, misalnya rantai DNA terputus dibanyak tempat, maka kerusakan ini tidak dapat diperbaiki, akhirnya sel akan mati.

Pada perbaikan DNA, nukleotida yang biasanya rusak, dapat diganti namun sering tak sempurna, sehingga terjadi mutasi. Bila mutasi ini terjadi pada jenis gen khusus, yaitu proto onko-gen atau anti onkogen maka dapat menimbulkan kanker. Rantai DNA yang terputus dapat disambung kembali, tetapi penyambungannya sering kurang sempurna sehingga terjadi translokasi (Evan and Bruedorfer, 1992).

II.3.3 Efek radikal bebas terhadap protein

Oksidan dapat merusak protein karena dapat bereaksi dengan asam amino penyusun protein, khususnya asam amino sistein yang mengandung gugusan sulfhidril (-SH).

Pembentukan ikatan disulfida menimbulkan ikatan intra maupun antar molekul protein sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya (misalnya enzim kehilangan aktivitasnya). Protein dapat juga bereaksi dengan aldehid hasil hasil peroksidasi lipid sehingga menimbulkan apa yang disebut AGE (*Advanced Glycoxylated Endproducts*) yang dapat merusak fungsi biologis protein (Evan and Bruedorfer, 1992).

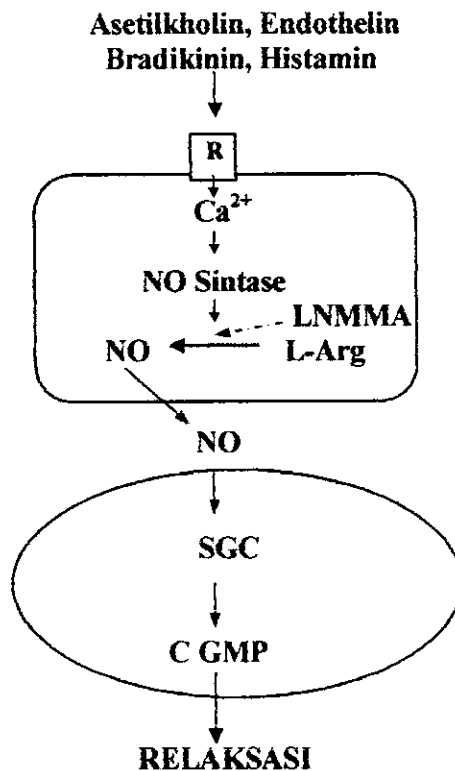
II.4 Malondialdehyde (MDA)

Dengan semakin banyaknya laporan dari berbagai penelitian yang menunjukkan adanya keterlibatan dari radikal bebas pada berbagai penyakit, maka salah satu cara untuk

mengetahui keterlibatan radikal bebas ini, digunakan metode pengukuran kadar MDA. Hal ini karena malondialdehyde merupakan bentuk senyawa yang paling banyak ditemukan sebagai hasil dari lipid peroksidasi. Pada berbagai jaringan, MDA akan dimetabolisme melalui proses oksidasi oleh aldehyde dehidrogenase menjadi asam malonat yang merupakan inhibitor kompetitif dengan suksinat dehidrogenase di dalam mitokondria. Selanjutnya melalui proses dekarboksilasi, asam malonat akan berubah menjadi acetaldehyde.

II.5 Mekanisme Relaksasi Aorta (Otot Polos Pembuluh Darah) dari Asetilkolin

Furchgott and Zawadzki (1980) dan Sudjarwo *et al* (1992) melaporkan bahwa relaksasi yang tergantung pada endothelium yang disebabkan oleh asetilkolin, histamin, endothelin, bradikinin dan ionophore A23187 berhubungan dengan meningkatnya kadar Nitrik Oksid/EDRF pada aorta tikus dan kelinci (gambar 1). Kerusakan endothelium ini dapat menghambat relaksasi otot polos pembuluh darah dan kadar Nitrik Oksid.



Gambar 1. Mekanisme relaksasi otot polos pembuluh darah dari Asetilkolin, endothelin, bradikinin dan histamin

Pada endothelium pembuluh darah aorta, asetilkolin dan endothelin dapat menyebabkan peningkatan kalsium influk dan kalsium release sehingga dapat mengakibatkan kalsium intrasel juga akan meningkat. Peningkatan kalsium intrasel akan mengaktivasi sintase nitrik oksid yang selanjutnya dapat menyebabkan pembentukan dan pelepasan nitrik oksid /EDRF. Inhibitor dari sintase nitrik oksid seperti LNMMA dapat menghambat pembentukan EDRF tetapi tidak dapat menghambat kalsium intrasel endothelium (Sudjarwo *et al*, 1992). Pada otot polos pembuluh darah, EDRF akan mengaktivasi adenil siklase yang dapat mengakibatkan terjadinya perubahan GTP menjadi c GMP sehingga produksi c GMP meningkat . Peningkatan siklik GMP dapat menyebabkan relaksasi otot polos. Inhibitor dari NO sintase seperti LNMMA dan pengosongan kalsium ekstrasel dapat menghambat relaksasi otot polos pembuluh darah karena adanya hambatan produksi c GMP (Sudjarwo *et al.*, 1992)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

III.1. Tujuan Penelitian

Dengan semakin meningkatnya kasus hiperkholesterolemia yang dapat menyebabkan kerusakan sel endothelium sehingga dapat menimbulkan gangguan pada kardiovaskuler seperti atherosklerosis, gagal jantung dan hipertensi yang merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di Indonesia. Untuk mencegah kerusakan sel endothelium maka pada penelitian ini secara umum bertujuan untuk mencari obat alternatif dan mengembangkan obat yang potent, murah, aman dan mudah didapatkan, salah satu diantaranya adalah Isoflavonoid yang dapat digunakan untuk melindungi sel endothelium sehingga dapat mencegah terjadinya gangguan kardiovaskuler. Sedangkan secara khusus penelitian ini bertujuan untuk :

- a. Membuktikan bahwa Isoflavonoid dapat menghambat peningkatan kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada kelinci hiperkholesterolemia
- b. Membuktikan bahwa Isoflavonoid dapat meningkatkan pelepasan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) dari sel endothelium pada kelinci hiperkholesterolemia
- c. Membuktikan bahwa Isoflavonoid dapat meningkatkan produksi c GMP pada kelinci hiperkholesterolemia

III.2. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk :

- a. Memberikan informasi bahwa Isoflavonoid dapat digunakan sebagai obat alternatif untuk mencegah kerusakan sel endothelium sehingga dapat digunakan untuk menghambat terjadinya gangguan kardiovaskuler.
- b. Isoflavonoid dapat digunakan untuk menurunkan kadar Malondialdehyde dan meningkatkan EDRF release dari sel endothelium pada hiperkholesterolemia

BAB IV

METODE PENELITIAN

IV.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi FK UNAIR Surabaya dari tanggal 25 Juni 2006 sampai tanggal 30 september 2006.

IV.2. Materi Penelitian

IV.2.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah Noradrenalin, Asetilkolin yang diperoleh dari Sigma chemical industries. Sedangkan isoflavonoid dan kolesterol didapatkan dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Tokyo Jepang. Larutan krebs dibuat dari NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 Mm, CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, EDTA 0,01 mM dan glukose 5,5 mM dan diberi O₂ 95 % dan CO₂ 5 %, KIT cyclic GMP dari Cayman chemical company Ann Arbor USA

IV.2.2 Hewan coba

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci jantan dengan berat badan 1.5 – 2 kg yang diperoleh dari peternakan kelinci di Batu, Malang.

IV.2.3 Alat penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah Isolated organ bath, rekorder, amplifier, spektrofotometer, ELISA reader

IV.3. Prosedure Penelitian

IV.3.1. Induksi hiperkholesterolemia

Untuk membuat hyperkholesterolemia pada kelinci dapat dilakukan dengan cara Inoue and Nishida (1998) yaitu dengan cara memberi makanan yang dicampur dengan kolesterol 2 % selama 8 minggu.

IV.3.2. Perlakuan terhadap hewan coba

24 ekor kelinci setelah diadaptasikan selama satu minggu, ditimbang berat badannya dan secara acak dibagi menjadi 4 kelompok sebagai berikut :

Kelompok Kontrol Negatif :

6 ekor kelinci diberi makanan tanpa kholesterol dan diberi pelarut isoflavonoid

Kelompok Kontrol Positif :

6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kholesterol dan diberi pelarut isoflavonoid

Kelompok Perlakuan I :

6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kholesterol dan diberi isoflavonoid dengan dosis 100 mg/kg berat badan

Kelompok Perlakuan II :

6 ekor kelinci diberi makanan yang dicampur kholesterol dan diberi isoflavonoid dengan dosis 200 mg/kg berat badan

Setelah 8 minggu dari perlakuan, pada semua hewan percobaan diambil darahnya untuk diperiksa kadar MDA (Malondialdehyde). Selanjutnya semua hewan percobaan dibunuh dan diambil pembuluh darahnya yaitu aorta untuk diperiksa EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) dan kadar cGMP nya.

IV.3.3 Pemeriksaan sampel

a. Pemeriksaan kadar Malondialdehyde (MDA)

Penetapan kadar Malondialdehyde dalam darah dilakukan dengan metode Espinosa-mansilla, 1993. Pengukurannya berdasarkan jumlah malondialdehyde yang bereaksi dengan reagen asam tiobarbiturat. Kadar malondialdehyde yang terdeteksi ini dianggap identik dengan konsentrasi lipid peroksid plasma.

b. Pemeriksaan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) release secara in vitro

Pemeriksaan EDRF release dilakukan dengan cara Karaki dan Sudjarwo (1993) yaitu pembuluh darah aorta yang endotheliumnya masih utuh dipisahkan secara cepat dari tubuh kelinci, kemudian dibersihkan dari jaringan lemak dan dipotong dalam bentuk ring

dengan lebar 3 mm. Kemudian diinkubasikan kedalam isolated organ bath yang berisi larutan krebs yang terdiri dari NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 Mm CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, EDTA 0,01 mM dan glukose 5,5 mM dan diberi oksigen 95 % dan CO₂ 5 %. Salah satu ujung aorta di fiksasi pada kait yang terdapat pada organ bath, sedangkan ujung yang lain dihubungkan dengan transduser, amplifier dan recorder untuk mencatat relaksasi dan kontraksi aorta yang terjadi. Kemudian ditambah Noradrenalin 100 nM untuk membuat kontraksi aorta, setelah 10 menit kemudian ditambahkan Asetilkolin dengan konsentrasi 10 nM, 100 nM dan 1 µM. Besarnya relaksasi akibat pemberian Asetilkolin dibagi dengan besarnya kontraksi yang ditimbulkan oleh noradrenalin dan hasilnya dikalikan 100 %. Hasil ini memperlihatkan besarnya EDRF release dari sel endothelium.

c. Pemeriksaan kadar cyclic GMP secara in vitro

Pengukuran cyclic GMP dilakukan dengan cara dari Fujitani (1993) yaitu pembuluh darah aorta dipisahkan secara cepat dari tubuh tikus, kemudian dipisahkan dari jaringan lemak dan di inkubasikan kedalam larutan krebs yang terdiri dari NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 Mm CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, EDTA 0,01 mM dan glukose 5,5 mM. Kemudian ditambahkan 100 nM Noradrenalin dan setelah 10 menit ditambah lagi dengan asetilkolin 1 µM. Setelah 1 menit aorta secara cepat dimasukkan kedalam cairan Nitrogen untuk dibekukan. Selanjutnya dipindahkan ke larutan 5 % Trichloroasetic acid dan di homogenasi dengan potter glas dalam putaran-butiran es. Homogenate disentrifuse pada 1700 x g selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diekstrak sebanyak 3 kali dengan menggunakan ether yang dicampur air. Kemudian di label dengan KIT cyclic GMP dari Cayman chemical company Ann Arbor USA.

IV.4. Rancangan Penelitian Dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dan data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA. Apabila hasil perlakuan yang diberikan terdapat perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji LSD.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1 Pengaruh Pemberian Isoflavonoid Terhadap Kadar MDA Darah Kelinci

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pada kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol selama 8 minggu (kontrol positif) menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan tanpa kolesterol (kontrol negatif), sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi Isoflavonoid dengan dosis 100 dan 200 mg/kg BB dan diberi makanan yang dicampur dengan kolesterol memperlihatkan adanya penurunan kadar MDA bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol.

Data hasil penelitian dari kadar MDA yang diperoleh ditabulasikan seperti yang tercantum pada lampiran 1, dan penghitungan statistik kadar MDA tercantum pada lampiran 2. Hasil rata-rata dan simpangan baku dari penghitungan kadar MDA dalam darah kelinci dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata dan simpangan baku kadar MDA kelinci dari berbagai kelompok

Kelompok	Kadar MDA ($\mu\text{M/ml}$)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$
Kontrol Negatif	3.62 ± 0.36^a
Kontrol Positif	7.22 ± 0.43^b
Isoflavonoid Dosis 100 mg/kg BB	6.75 ± 0.79^b
Isoflavonoid Dosis 200 mg/kg BB	5.20 ± 0.37^c

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna

Keterangan :

Kontrol Negatif : kelinci diberi makanan tanpa kolesterol

Kontrol Positif : kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol

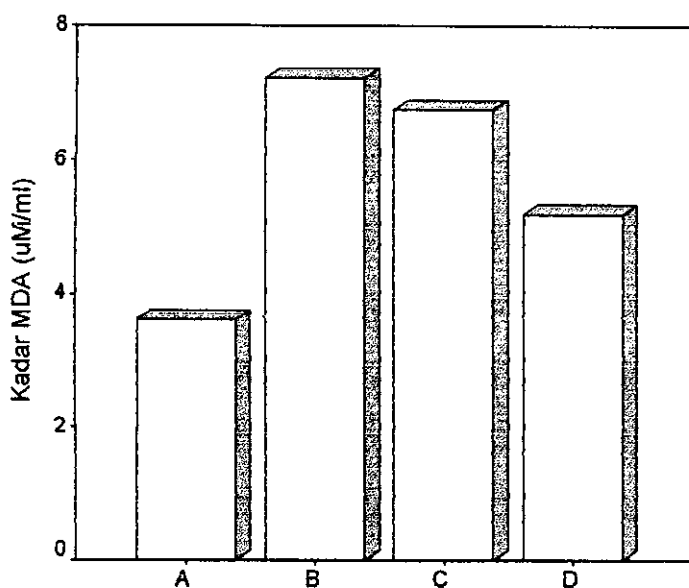
Isoflavonoid Dosis 100 mg/kg BB : kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Isoflavonoid dengan dosis 100 mg/kg berat badan

Isoflavonoid Dosis 200 mg/kg BB : kelinci diberi makanan yang dicampur kolesterol dan diberi Isoflavonoid dengan dosis 200 mg/kg berat badan

Pada penghitungan statistik dengan uji ANOVA terhadap kadar MDA, menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna diantara berbagai kelompok pada $p < 0.05$. Untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok maka dilakukan uji LSD. Pada kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kholestrol selama 8 minggu menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA yang berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kolesterol pada $p < 0.05$. Hasil ini sesuai dengan laporan bahwa pada kelinci yang diberi diet kholestrol selama 8 minggu dapat menyebabkan kenaikan kadar kholestrol (hiperkolesterolemia) dan dapat terjadi peningkatan produksi superoksida anion dari sel endothelium (Ohara *et al.*, 1992). Meningkatnya radikal bebas superoksida ini berhubungan dengan meningkatnya lipid peroksidasi plasma yang dapat diukur sebagai *Thiobarbituric acid-reactive substances* (TBARS) plasma yang diekspresikan sebagai MDA (Inoue and Nishida, 1998)

Pada kelompok kelinci yang diberi Isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB menunjukkan adanya penurunan kadar MDA yang berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kholestrol dan dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kolesterol pada $p < 0.05$. Sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi Isoflavonoid dosis 100 mg/kg BB memperlihatkan adanya penurunan kadar MDA yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya diberi kolesterol, tetapi berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa dicampur dengan kholestrol. Hasil ini menunjukkan bahwa isoflavonoid pada dosis 200 mg/kg BB bukan dosis 100 mg/kg BB dapat menurunkan total kolesterol, LDL, meningkatkan HDL dan mempunyai efek antioksidan yang kuat sehingga dapat menghambat pembentukan radikal bebas superoksida dan menghambat lipid peroksidasi (Hertog *et al.*, 1993; Kirk *et al.*, 1998; Merz-Demlow *et al.*, 2000). Telah dilaporkan bahwa antioksidan seperti vitamin C dan vitamin E mempunyai kemampuan menghambat lipid peroksidasi dan modifikasi oksidasi LDL sehingga dapat menghambat kenaikan kadar MDA (Pierdomenico *et al.*, 1998; Mahfouz *et al.*, 1997).

Baru-baru ini juga ditunjukkan bahwa antioksidan probukol dapat menurunkan pembentukan radikal bebas superoksida dari sel endothelium pembuluh darah pada kelinci hiperkolesterolemia, yang diperlihatkan dengan adanya penurunan TBARS plasma (Inoue and Nishida, 1998).



Gambar 2. Kadar MDA dari plasma kelinci. Kontrol negatif (A), kontrol positif (B), Isoflavonoid dosis 100 mg/Kg BB (C) dan Isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB (D).

Efek isoflavonoid dalam menurunkan kadar MDA tergantung pada dosis yang diberikan, semakin besar dosis Isoflavonoid yang diberikan semakin kuat penurunan kadar MDA nya seperti terlihat pada gambar 2. Penurunan kadar MDA yang nyata akibat pemberian isoflavonoid terlihat pada dosis 200 mg/kg BB. Hasil ini menunjukkan bahwa isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB merupakan dosis minimum untuk menurunkan kadar MDA pada kelinci yang makanannya dicampur kolesterol.

V.2 Pengaruh Pemberian Isoflavonoid Terhadap EDRF

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pada kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol selama 8 minggu, menunjukkan adanya hambatan pelepasan EDRF yang diperlihatkan dengan adanya hambatan relaksasi yang tergantung endothelium pada aorta akibat pemberian asetilkolin bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan tanpa kolesterol, sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi isoflavonoid dengan dosis 200 mg/kg BB bukan dosis 100 mg/kg BB memperlihatkan adanya peningkatan pelepasan EDRF yang berbeda nyata bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kolesterol .

Data hasil penelitian dari penglepasan EDRF yang diperoleh ditabulasikan seperti yang tercantum pada lampiran 3 dan dan penghitungan statistik penglepasan EDRF tercantum pada lampiran 4. Hasil rata-rata dan simpangan baku dari penghitungan penglepasan EDRF dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Rata-rata dan simpangan baku relaksasi dari asetilkholin pada aorta kelinci dari berbagai kelompok.

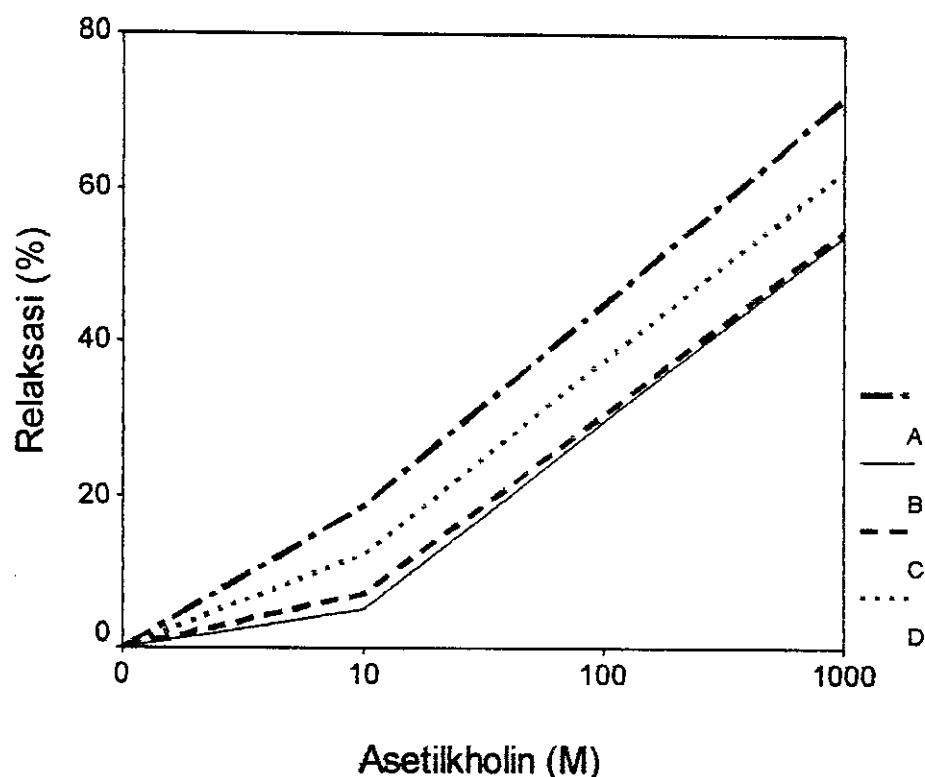
KELOMPOK	Efek Relaksasi Asetilkholin (%) Dosis		
	X ± SD		
	10 nM	100 nM	1 µM
Kontrol Negatif	18.7 ± 2.17 ^a	44.9 ± 3.35 ^d	71.9 ± 4.59 ^g
Kontrol Positif	5.1 ± 2.57 ^b	29.8 ± 3.14 ^e	53.9 ± 3.32 ^h
Isoflavonoid Dosis 100 mg/Kg BB	7.1 ± 3.41 ^b	30.6 ± 6.75 ^e	54.5 ± 9.31 ^h
Isoflavonoid Dosis 200 mg/Kg BB	12.3 ± 1.54 ^c	37.6 ± 2.05 ^f	62.5 ± 3.31 ⁱ

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna

Pemberian asetilkholin 10 nM, 100 nM, 1 µM dapat menyebabkan relaksasi yang tergantung endothelium pada aorta dari semua kelompok. Semakin besar dosis asetilkholin yang diberikan semakin kuat relaksasi yang ditimbulkannya.

Pada analisa varian terhadap penglepasan EDRF, menunjukan adanya perbedaan yang bermakna diantara berbagai kelompok pada $p < 0.05$. Untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok maka dilakukan uji LSD. Pada kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kholestrol selama 8 minggu menunjukan adanya hambatan relaksasi aorta akibat pemberian asetilkholin yang berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kolesterol pada $p < 0.05$. Telah dilaporkan bahwa pada keadaan hiperkholesterolemia dapat terjadi rangsangan pembentukan radikal bebas superoksida pada sel endothelium sehingga superoksida ini secara langsung dapat menginaktivasi EDRF dan juga dapat meningkatkan oksidasi LDL yang dapat merusak sel endothelium (Ohara *et al.*, 1992; Steinberg and Witztum, 1990). Pada hiperkholesterolemia, sel intima dapat menghasilkan superoksida yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan sel normal dan pemberian antioksidan dapat menghambat proses atherosklerosis dan dapat meningkatkan aktivitas EDRF (Simon *et al.*, 1993).

Pada kelompok kelinci yang diberi isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kholestrol pada $p < 0.05$. Sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi isoflavonoid dosis 100 mg/kg BB memperlihatkan adanya peningkatan relaksasi yang tergantung adanya endothelium akibat pemberian asetilkolin yang tidak berbeda nyata pada $p < 0.05$ seperti terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Relaksasi tergantung adanya endothelium yang disebabkan oleh asetilkolin (10 nM, 100 nM, 1 μ M) pada aorta kelinci yang dikonstraksi dengan Noradrenalin 1 μ M. A (Kontrol Negatif), B (Kontrol Positif), C (Isoflavonoid 100 mg/kg BB) dan D (Isoflavonoid 200 mg/kg BB)

Berdasarkan hasil tersebut diatas menunjukkan bahwa pemberian isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB dapat menghambat kerusakan sel endothelium pada kelinci hiperkholesterolemia sehingga pemberian isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB mampu meningkatkan relaksasi dari asetilkolin pada aorta yang tergantung adanya endothelium. Efek proteksi dari Isoflavonoid terhadap kerusakan sel endothelium pada hiperkholesterolemia ini karena isoflavonoid mempunyai efek antioksidan sehingga

mampu menghambat pembentukan radikal bebas superoksid dan dapat menghambat proses lipid peroksidasi. Hal ini akan menyebabkan peningkatan pelepasan EDRF. Inoue and Nishida (1998) melaporkan bahwa pemberian antioksidan probukol pada kelinci hyperkholesterolemia dapat menghambat lipid peroksidasi dan oksidasi LDL sehingga antioksidan probukol mampu meningkatkan relaksasi yang tergantung adanya endothelium.

V.3. Pengaruh Pemberian Isoflavonoid Terhadap produksi c GMP

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pada kelompok kelinci yang diberi makanan yang dicampur kholesterol selama 8 minggu, menunjukkan adanya hambatan produksi c GMP yang disebabkan oleh pemberian asetilkolin pada aorta bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang diberi makanan tanpa kholesterol, sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi isoflavonoid dengan dosis 100 mg/Kg BB, 200 mg/kg BB memperlihatkan adanya peningkatan produksi cGMP bila dibandingkan dengan kelompok kelinci yang hanya diberi makanan yang dicampur kholesterol. Data hasil penelitian dari kadar cGMP yang diperoleh ditabulasikan seperti yang tercantum pada lampiran 5 dan penghitungan statistik kadar cGMP tercantum pada lampiran 6. Hasil rata-rata dan simpangan baku dari penghitungan produksi cGMP dapat dilihat pada tabel 4.

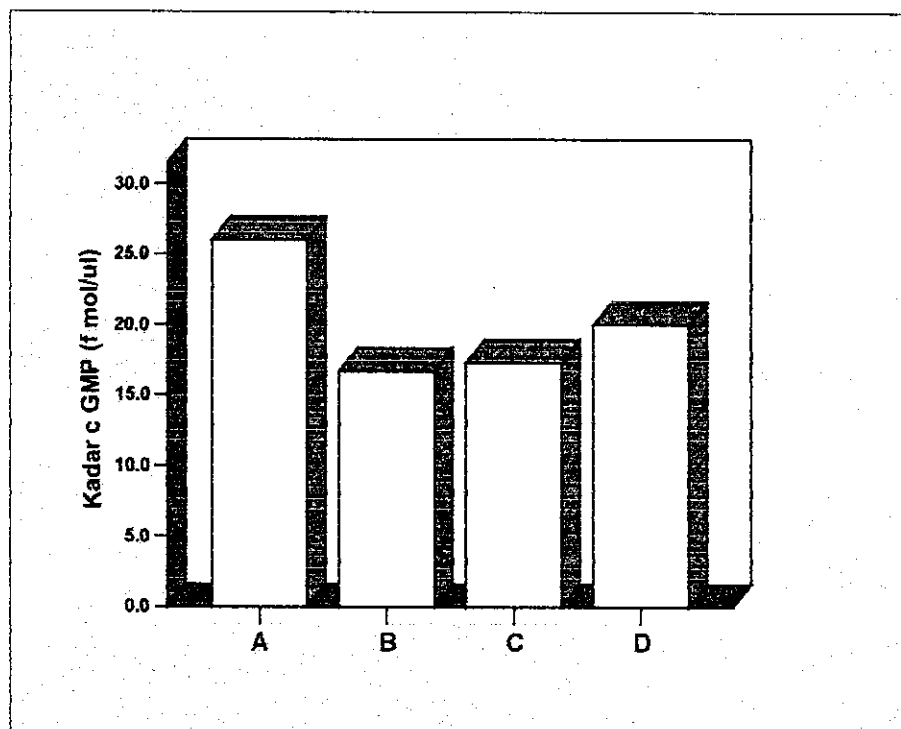
Tabel 4. Rata-rata dan simpangan baku kadar c GMP dari berbagai kelompok.

Kelompok	Kadar c GMP (f mol/ μ g) dari Asetilkolin 1 μ M
Kontrol Negatif	26 \pm 2 ^a
Kontrol Positif	16.7 \pm 1.6 ^b
Isoflavonoid Dosis 100 mg/kg BB	17.3 \pm 2.2 ^b
Isoflavonoid Dosis 200 mg/kg BB	20 \pm 1.8 ^c

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna

Pada uji statistik analisa varian terhadap kadar c GMP, menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna diantara berbagai kelompok pada $p < 0.05$. Untuk menentukan

apakah terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok maka dilakukan uji LSD. Pada kelinci yang diberi makanan yang dicampur dengan kholestrol selama 8 minggu menunjukkan adanya hambatan pada asetilkolin untuk memproduksi c GMP yang berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kholesterol dan juga dengan kelompok kelinci yang diberi isoflavonoid dengan dosis 200 mg/kg BB pada $p < 0.01$. Sedangkan pada kelompok kelinci yang diberi isoflavonoid dengan dosis 200 mg/kg BB memperlihatkan adanya peningkatan kadar c GMP yang diproduksi oleh asetilkolin yang berbeda nyata dengan kelompok kelinci yang makanannya tanpa diberi kholesterol dan juga dengan kelompok kelinci yang diberi isoflavonoid dengan dosis 100 mg/Kg BB pada $p < 0.01$ seperti terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Kadar c GMP yang diproduksi oleh asetilkolin $1 \mu\text{M}$ pada aorta kelinci yang dikontraksi dengan Noradrenalin $1 \mu\text{M}$. Kontrol negatif (A), kontrol positif (B), isoflavonoid dosis 100 mg/Kg BB (C) dan isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB (D).

Berdasarkan hasil tersebut diatas menunjukkan bahwa pemberian isoflavonoid dengan dosis 200 mg/Kg BB bukan dosis 100 mg/kg BB dapat menghambat kerusakan sel endothelium pada kelinci hyperkholesterolemia sehingga pemberian isoflavonoid dosis

200 mg/Kg BB dapat meningkatkan efek asetilkolin dalam melepaskan EDRF dari sel endothelium. EDRF ini akan mengaktivasi guanil siklase sehingga akan terjadi perubahan GTP menjadi c GMP, akibatnya terjadi peningkatan c GMP yang dapat merelaksasi otot polos aorta. Hasil ini sesuai dengan laporan dari Sudjarwo *et al* (1992) yang melakukan penelitian pada aorta tikus yang endotheliumnya dirusak kemudian diberi asetilkolin, hasilnya menunjukkan bahwa terjadi hambatan pada asetilkolin dalam melepaskan EDRF sehingga dapat menurunkan kadar c GMP. Hal ini dapat menyebabkan hambatan pada relaksasi otot polos pembuluh darah akibat pemberian asetilkolin

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan :

- a. Pemberian isoflavonoid dosis 200 mg/kg dapat menurunkan kadar MDA pada kelinci hiperkolesterolemia.
- b. Pemberian isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB dapat meningkatkan penglepasan EDRF pada kelinci hiperkolesterolemia
- c. Pemberian isoflavonoid dosis 200 mg/kg BB dapat meningkatkan produksi cGMP pada kelinci hiperkolesterolemia
- d. Pemberian isoflavonoid dosis 200 mg/kg dapat melindungi kerusakan sel endothelium pada kelinci hiperkolesterolemia.

VI.2. Saran

Berdasarkan penelitian diatas disarankan untuk :

- a. Melakukan penelitian lanjutan dengan perlakuan yang sama, dengan mengukur kadar nitrik oksid.
- b. Menggali lebih dalam potensi isoflavonoid untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat kardiovaskuler

DAFTAR PUSTAKA

- Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke GL. 1996.** Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr*;126:43-50.
- Boger RH and Frolich JC. 1997.** Dietary L arginine reduce the progression of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits: Comparison with lovastatin. *Circulation*. 96:1282-1290.
- Chin-Dusting JP, Fisher LJ, Lewis TV, Piekarska A, Nestel PJ, Husband A. 2001.** The vascular activity of some isoflavone metabolites: Implications for a cardioprotective role. *Br J Pharmacol*;133:595-605.
- Clarkson TB, Anthony MS. 1998.** Phytoestrogens and coronary heart disease. *Baillières Clin Endocrinol Metab*;12:589-604.
- Cooke JP., Singer AH and Tsao P. 1992.** Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J clin Invest*. 90: 1168-1172.
- Drexler H. 1996.** Endothelial function in heart failure. Some Unsolved Issues. *European Heart Journal*. 17: 1775-1777.
- Dusting GJ, Dart AM. 1999.** Endothelial dysfunction associated with cardiovascular disease and transplantation; in Mathie RT, Griffith TM (eds): *The Haemodynamic Effects of Nitric Oxide*. London, Imperial College Press. 417-440.
- Evan CR and Brueddorfer. 1992.** Free radical, lipoprotein and cardiovascular disfunction. *Am J. Hypertension*. 8: 28-41
- Flavahan NA. 1992.** Atherosclerosis of lipoprotein-induced endothelial dysfunction: potential mechanisms underlying reduction in EDRF nitric oxide activity. *Circulation*. 85: 1927-1938.
- Furchgott and Zawadzki JV. 1980.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288: 375-376
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet*;342:1007-1011.
- Howes JB, Sullivan D, Lai N, Nestel P, Pomeroy S, West L, Eden JA, Howes LG. 2000.** The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*;152:143-147.

- Inoue N and Nishida K. 1998.** Probucol improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits. *Am.J.Med.Sci.* 242-247.
- Inoue N., Hirata K and Yamada M. 1992.** Lysophosphatidylcholine inhibits bradykinin induced phosphoinositide hydrolysis and calcium transients in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res.* 71: 1410-1423.
- Karaki H and Sudjarwo SA. 1993.** Induction of endothelium dependent relaxation in the rat aorta by IRL 1620, a novel and selective agonist at the endothelin ETB receptor. *Br. J. Pharmacol.* 109: 371-374.
- Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC. 1998.** Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*;128:954-959.
- Kelly G., Husband A and Waring M. 1997.** Phenolic phytoestrogen. *Clinical Monograph Australia. Novogen Limited* pp 3-11
- Knight DC., Wall PL and Eden JA. 1999.** A review of phytoestrogen and their effect in relations to menopausal symptoms. Centre for management of the Menopause. Royal Hospital for Women Sydney.
- Mahfouz MM., Kawano H and Kummerow FA. 1997.** Effect of cholesterol rich diets with and without added vitamin E and C on the severity of the atherosclerosis in rabbits. *Am.J.Clin.Nutr.* 1240-1249.
- Mei B and Chen WZ. 1994.** Protective effects of ginsenosides on oxygen free radical induce damages. *Yao.Hsueh.Pao* 29:801-808.
- Merz-Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS. 2000.** Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr*;71:1462-1469.
- Meredith IT, Yeung AC and Weidinger FF. 1993.** Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestation of coronary artery disease. *Circulation.* 87: 56-66.
- Miwa Y., Hirata K and Matsuda Y. 1993.** Lysophosphatidylcholine inhibits agonist-induced calcium mobilization in endothelial cells of isolated rabbits aorta. *Circulation.* 88: 1621.
- Ohara Y., Peterson TE and Harrison DG. 1992.** Hypercholesterolemia increases superoxide anion. *Circulation.* 86: 1222.
- Pierdomenico SD., Costantino F and Mezetti A. 1998.** LDL oxidation and Vitamin E and C in sustained and white coat hypertension. *Hypertension.* 31: 621-626.

- Simon BC., Haudenschild CC and Cohen RA. 1993.** Preservation of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *J Cardiovasc Pharmacol.* 21: 893-901.
- Sudjarwo SA., Hori M and Karki H. 1992.** Effect of endothelin-3 on cytosolic calcium level in vascular endothelium and on smooth muscle contraction. *Eur.J. Pharmacol.*229. 137
- Steinberg and Witztum JI. 1990.** Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br. Heart J.* 69: 512-518.
- Teixeira SR, Potter SM, Weigel R, Hannum S, Erdman JW Jr, Hasler CM. 2000.** Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr;*71:1077-1084.
- Tikkanen MJ, Adlercreutz H. 2000.** Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem Pharmacol;*60:1-5.
- Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. 2001.** Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr;*73:225-231.
- Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. 1995.** Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med ;*208:124-130.

Lampiran 1. Kadar MDA dari berbagai Kelompok.

Ulangan	Kadar MDA ($\mu\text{M}/\text{ml}$)			
	Kontrol +	Kontrol -	Isoflavonoid 100 mg/kg BB	Isoflavonoid 200 mg/Kg BB
1	7.2	3.7	6.3	5.3
2	7.9	3.9	6.1	4.9
3	7.1	4.1	6.1	5.1
4	7.5	3.1	7.8	5.5
5	6.9	3.5	7.7	4.7
6	6.7	3.4	6.5	5.7

Lampiran 2. Analisis statistik kadar MDA dari berbagai Kelompok

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	47.958	3	15.986	59.299	.000
Within Groups	5.392	20	.270		
Total	53.350	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DATA

LSD

(I) PERLAKUA	(J) PERLAKUA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Neg	Kontrol Pos	-3.6000*	.2998	.000	-4.2253	-2.9747
	Dosis 1	-3.1333*	.2998	.000	-3.7586	-2.5080
	Dosis 2	-1.5833*	.2998	.000	-2.2086	-.9580
Kontrol Pos	Kontrol Neg	3.6000*	.2998	.000	2.9747	4.2253
	Dosis 1	.4667	.2998	.135	-.1586	1.0920
	Dosis 2	2.0167*	.2998	.000	1.3914	2.6420
Dosis 1	Kontrol Neg	3.1333*	.2998	.000	2.5080	3.7586
	Kontrol Pos	-.4667	.2998	.135	-1.0920	.1586
	Dosis 2	1.5500*	.2998	.000	.9247	2.1753
Dosis 2	Kontrol Neg	1.5833*	.2998	.000	.9580	2.2086
	Kontrol Pos	-2.0167*	.2998	.000	-2.6420	-1.3914
	Dosis 1	-1.5500*	.2998	.000	-2.1753	-.9247

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 3. Data relaksasi asetilkolin pada aorta kelinci dari berbagai kelompok

No	Relaksasi dari Asetilkolin (%) pada :											
	Kontrol negatif			Kontrol positif			Isoflavonoid 100 mg/kg BB			Isoflavonoid 200 mg/kg BB		
	10 nm	100 nm	1 µm	10 nm	100 nm	1 µm	10 nm	100 nm	1 µm	10 nm	100 nm	1 µm
1	21.2	47.6	71.3	5.7	27.1	53.3	10	25.2	55	13.1	37.6	67.7
2	19.7	42.1	77.5	2.3	32.1	57.5	6.4	31.6	61.4	12.2	35.6	58.9
3	18.9	45.3	65.6	4.6	25.2	55.6	11.8	26.7	63.2	11.9	39.6	63.3
4	15.7	49.7	71.7	2.5	29.7	51.7	5.9	23.1	45.1	9.8	37.7	60
5	16.5	43.6	68.9	9.1	33.6	48.9	2.1	39.9	41.2	14.5	34.9	60.5
6	20.3	40.9	76.9	6.4	30.9	56.9	6.1	36.9	61.2	12.5	40.0	64.5

Lampiran 4. Analisis statistik relaksasi asetilkolin dari berbagai Kelompok

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32777.014	11	2979.729	158.190	.000
Within Groups	1130.183	60	18.836		
Total	33907.198	71			

Dependent Variable: data

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kon Neg Ach1	Kon Neg Ach2	-26.15000*	2.50575	.000	-31.1623	-21.1377
	Kon Neg Ach3	-53.26667*	2.50575	.000	-58.2789	-48.2544
	Kon Pos Ach1	13.61667*	2.50575	.000	8.6044	18.6289
	Kon Pos Ach2	-11.05000*	2.50575	.000	-16.0623	-6.0377
	Kon Pos Ach3	-35.26667*	2.50575	.000	-40.2789	-30.2544
	Iso D1 Ach1	11.66667*	2.50575	.000	6.6544	16.6789
	Iso D1 Ach2	-11.85000*	2.50575	.000	-16.8623	-6.8377
	Iso D1 Ach3	-35.80000*	2.50575	.000	-40.8123	-30.7877
	Iso D2 Ach1	6.38333*	2.50575	.013	1.3711	11.3956
	Iso D2 Ach2	-18.85000*	2.50575	.000	-23.8623	-13.8377
	Iso D2 Ach3	-43.76667*	2.50575	.000	-48.7789	-38.7544
Kon Neg Ach2	Kon Neg Ach1	26.15000*	2.50575	.000	21.1377	31.1623
	Kon Neg Ach3	-27.11667*	2.50575	.000	-32.1289	-22.1044
	Kon Pos Ach1	39.76667*	2.50575	.000	34.7544	44.7789
	Kon Pos Ach2	15.10000*	2.50575	.000	10.0877	20.1123
	Kon Pos Ach3	-9.11667*	2.50575	.001	-14.1289	-4.1044
	Iso D1 Ach1	37.81667*	2.50575	.000	32.8044	42.8289
	Iso D1 Ach2	14.30000*	2.50575	.000	9.2877	19.3123
	Iso D1 Ach3	-9.65000*	2.50575	.000	-14.6623	-4.6377
	Iso D2 Ach1	32.53333*	2.50575	.000	27.5211	37.5456
	Iso D2 Ach2	7.30000*	2.50575	.005	2.2877	12.3123
	Iso D2 Ach3	-17.61667*	2.50575	.000	-22.6289	-12.6044
Kon Neg Ach3	Kon Neg Ach1	53.26667*	2.50575	.000	48.2544	58.2789
	Kon Neg Ach2	27.11667*	2.50575	.000	22.1044	32.1289
	Kon Pos Ach1	66.88333*	2.50575	.000	61.8711	71.8956
	Kon Pos Ach2	42.21667*	2.50575	.000	37.2044	47.2289
	Kon Pos Ach3	18.00000*	2.50575	.000	12.9877	23.0123
	Iso D1 Ach1	64.93333*	2.50575	.000	59.9211	69.9456
	Iso D1 Ach2	41.41667*	2.50575	.000	36.4044	46.4289
	Iso D1 Ach3	17.46667*	2.50575	.000	12.4544	22.4789
	Iso D2 Ach1	59.65000*	2.50575	.000	54.6377	64.6623
	Iso D2 Ach2	34.41667*	2.50575	.000	29.4044	39.4289
	Iso D2 Ach3	9.50000*	2.50575	.000	4.4877	14.5123

Multiple Comparisons

Dependent Variable: data

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kon Pos Ach1	Kon Neg Ach1	-13.61667*	2.50575	.000	-18.6289	-8.6044
	Kon Neg Ach2	-39.76667*	2.50575	.000	-44.7789	-34.7544
	Kon Neg Ach3	-66.88333*	2.50575	.000	-71.8956	-61.8711
	Kon Pos Ach2	-24.66667*	2.50575	.000	-29.6789	-19.6544
	Kon Pos Ach3	-48.88333*	2.50575	.000	-53.8956	-43.8711
	Iso D1 Ach1	-1.95000	2.50575	.440	-6.9623	3.0623
	Iso D1 Ach2	-25.46667*	2.50575	.000	-30.4789	-20.4544
	Iso D1 Ach3	-49.41667*	2.50575	.000	-54.4289	-44.4044
	Iso D2 Ach1	-7.23333*	2.50575	.005	-12.2456	-2.2211
	Iso D2 Ach2	-32.46667*	2.50575	.000	-37.4789	-27.4544
	Iso D2 Ach3	-57.38333*	2.50575	.000	-62.3956	-52.3711
Kon Pos Ach2	Kon Neg Ach1	11.05000*	2.50575	.000	6.0377	16.0623
	Kon Neg Ach2	-15.10000*	2.50575	.000	-20.1123	-10.0877
	Kon Neg Ach3	-42.21667*	2.50575	.000	-47.2289	-37.2044
	Kon Pos Ach1	24.66667*	2.50575	.000	19.6544	29.6789
	Kon Pos Ach3	-24.21667*	2.50575	.000	-29.2289	-19.2044
	Iso D1 Ach1	22.71667*	2.50575	.000	17.7044	27.7289
	Iso D1 Ach2	-.80000	2.50575	.751	-5.8123	4.2123
	Iso D1 Ach3	-24.75000*	2.50575	.000	-29.7623	-19.7377
	Iso D2 Ach1	17.43333*	2.50575	.000	12.4211	22.4456
	Iso D2 Ach2	-7.80000*	2.50575	.003	-12.8123	-2.7877
	Iso D2 Ach3	-32.71667*	2.50575	.000	-37.7289	-27.7044
Kon Pos Ach3	Kon Neg Ach1	35.26667*	2.50575	.000	30.2544	40.2789
	Kon Neg Ach2	9.11667*	2.50575	.001	4.1044	14.1289
	Kon Neg Ach3	-18.00000*	2.50575	.000	-23.0123	-12.9877
	Kon Pos Ach1	48.88333*	2.50575	.000	43.8711	53.8956
	Kon Pos Ach2	24.21667*	2.50575	.000	19.2044	29.2289
	Iso D1 Ach1	46.93333*	2.50575	.000	41.9211	51.9456
	Iso D1 Ach2	23.41667*	2.50575	.000	18.4044	28.4289
	Iso D1 Ach3	-.53333	2.50575	.832	-5.5456	4.4789
	Iso D2 Ach1	41.65000*	2.50575	.000	36.6377	46.6623
	Iso D2 Ach2	16.41667*	2.50575	.000	11.4044	21.4289
	Iso D2 Ach3	-8.50000*	2.50575	.001	-13.5123	-3.4877

Multiple Comparisons

Dependent Variable: data

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Iso D1 Ach1	Kon Neg Ach1	-11.66667*	2.50575	.000	-16.6789	-6.6544
	Kon Neg Ach2	-37.81667*	2.50575	.000	-42.8289	-32.8044
	Kon Neg Ach3	-64.93333*	2.50575	.000	-69.9456	-59.9211
	Kon Pos Ach1	1.95000	2.50575	.440	-3.0623	6.9623
	Kon Pos Ach2	-22.71667*	2.50575	.000	-27.7289	-17.7044
	Kon Pos Ach3	-46.93333*	2.50575	.000	-51.9456	-41.9211
	Iso D1 Ach2	-23.51667*	2.50575	.000	-28.5289	-18.5044
	Iso D1 Ach3	-47.46667*	2.50575	.000	-52.4789	-42.4544
	Iso D2 Ach1	-5.28333*	2.50575	.039	-10.2956	-.2711
	Iso D2 Ach2	-30.51667*	2.50575	.000	-35.5289	-25.5044
	Iso D2 Ach3	-55.43333*	2.50575	.000	-60.4456	-50.4211
	Iso D1 Ach2	Kon Neg Ach1	11.85000*	2.50575	.000	6.8377
Kon Neg Ach2		-14.30000*	2.50575	.000	-19.3123	-9.2877
Kon Neg Ach3		-41.41667*	2.50575	.000	-46.4289	-36.4044
Kon Pos Ach1		25.48667*	2.50575	.000	20.4544	30.4789
Kon Pos Ach2		.80000	2.50575	.751	-4.2123	5.8123
Kon Pos Ach3		-23.41667*	2.50575	.000	-28.4289	-18.4044
Iso D1 Ach1		23.51667*	2.50575	.000	18.5044	28.5289
Iso D1 Ach3		-23.95000*	2.50575	.000	-28.9623	-18.9377
Iso D2 Ach1		18.23333*	2.50575	.000	13.2211	23.2456
Iso D2 Ach2		-7.00000*	2.50575	.007	-12.0123	-1.9877
Iso D2 Ach3		-31.91667*	2.50575	.000	-36.9289	-26.9044
Iso D1 Ach3		Kon Neg Ach1	35.80000*	2.50575	.000	30.7877
	Kon Neg Ach2	9.65000*	2.50575	.000	4.6377	14.6623
	Kon Neg Ach3	-17.46667*	2.50575	.000	-22.4789	-12.4544
	Kon Pos Ach1	49.41667*	2.50575	.000	44.4044	54.4289
	Kon Pos Ach2	24.75000*	2.50575	.000	19.7377	29.7623
	Kon Pos Ach3	.53333	2.50575	.832	-4.4789	5.5456
	Iso D1 Ach1	47.46667*	2.50575	.000	42.4544	52.4789
	Iso D1 Ach2	23.95000*	2.50575	.000	18.9377	28.9623
	Iso D2 Ach1	42.18333*	2.50575	.000	37.1711	47.1956
	Iso D2 Ach2	16.95000*	2.50575	.000	11.9377	21.9623
	Iso D2 Ach3	-7.96667*	2.50575	.002	-12.9789	-2.9544

Multiple Comparisons

Dependent Variable: data

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Iso D2 Ach1	Kon Neg Ach1	-6.38333*	2.50575	.013	-11.3956	-1.3711
	Kon Neg Ach2	-32.53333*	2.50575	.000	-37.5456	-27.5211
	Kon Neg Ach3	-59.65000*	2.50575	.000	-64.6623	-54.6377
	Kon Pos Ach1	7.23333*	2.50575	.005	2.2211	12.2456
	Kon Pos Ach2	-17.43333*	2.50575	.000	-22.4456	-12.4211
	Kon Pos Ach3	-41.65000*	2.50575	.000	-46.6623	-36.6377
	Iso D1 Ach1	5.28333*	2.50575	.039	.2711	10.2956
	Iso D1 Ach2	-18.23333*	2.50575	.000	-23.2456	-13.2211
	Iso D1 Ach3	-42.18333*	2.50575	.000	-47.1956	-37.1711
	Iso D2 Ach2	-25.23333*	2.50575	.000	-30.2456	-20.2211
	Iso D2 Ach3	-50.15000*	2.50575	.000	-55.1623	-45.1377
	Iso D2 Ach2	Kon Neg Ach1	18.85000*	2.50575	.000	13.8377
Kon Neg Ach2		-7.30000*	2.50575	.005	-12.3123	-2.2877
Kon Neg Ach3		-34.41667*	2.50575	.000	-39.4289	-29.4044
Kon Pos Ach1		32.46667*	2.50575	.000	27.4544	37.4789
Kon Pos Ach2		7.80000*	2.50575	.003	2.7877	12.8123
Kon Pos Ach3		-16.41667*	2.50575	.000	-21.4289	-11.4044
Iso D1 Ach1		30.51667*	2.50575	.000	25.5044	35.5289
Iso D1 Ach2		7.00000*	2.50575	.007	1.9877	12.0123
Iso D1 Ach3		-16.95000*	2.50575	.000	-21.9623	-11.9377
Iso D2 Ach1		25.23333*	2.50575	.000	20.2211	30.2456
Iso D2 Ach3		-24.91667*	2.50575	.000	-29.9289	-19.9044
Iso D2 Ach3		Kon Neg Ach1	43.76667*	2.50575	.000	38.7544
	Kon Neg Ach2	17.61667*	2.50575	.000	12.6044	22.6289
	Kon Neg Ach3	-9.50000*	2.50575	.000	-14.5123	-4.4877
	Kon Pos Ach1	57.38333*	2.50575	.000	52.3711	62.3956
	Kon Pos Ach2	32.71667*	2.50575	.000	27.7044	37.7289
	Kon Pos Ach3	8.50000*	2.50575	.001	3.4877	13.5123
	Iso D1 Ach1	55.43333*	2.50575	.000	50.4211	60.4456
	Iso D1 Ach2	31.91667*	2.50575	.000	26.9044	36.9289
	Iso D1 Ach3	7.96667*	2.50575	.002	2.9544	12.9789
	Iso D2 Ach1	50.15000*	2.50575	.000	45.1377	55.1623
	Iso D2 Ach2	24.91667*	2.50575	.000	19.9044	29.9289

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 5. Kadar c GMP Dari Berbagai Kelompok

Ulangan	Kadar c GMP (f mol/ μ l)			
	Kontrol -	Kontrol +	Isoflavonoid 100 mg/kg BB	Isoflavonoid 200 mg/kg BB
1	26	15	17	21
2	23	19	14	19
3	29	15	18	18
4	25	18	19	19
5	26	17	20	23
6	27	16	16	20

Lampiran 6. Analisis statistik produksi c GMP dari berbagai Kelompok

ANOVA

data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	325.333	3	108.444	29.847	.000
Within Groups	72.667	20	3.633		
Total	398.000	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: data

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kon Neg	Kon Pos	9.33333*	1.10050	.000	7.0377	11.6289
	Iso dosis 1	8.66667*	1.10050	.000	6.3711	10.9623
	Iso dosis 2	6.00000*	1.10050	.000	3.7044	8.2956
Kon Pos	Kon Neg	-9.33333*	1.10050	.000	-11.6289	-7.0377
	Iso dosis 1	-.66667	1.10050	.551	-2.9623	1.6289
	Iso dosis 2	-3.33333*	1.10050	.007	-5.6289	-1.0377
Iso dosis 1	Kon Neg	-8.66667*	1.10050	.000	-10.9623	-6.3711
	Kon Pos	.66667	1.10050	.551	-1.6289	2.9623
	Iso dosis 2	-2.66667*	1.10050	.025	-4.9623	-.3711
Iso dosis 2	Kon Neg	-6.00000*	1.10050	.000	-8.2956	-3.7044
	Kon Pos	3.33333*	1.10050	.007	1.0377	5.6289
	Iso dosis 1	2.66667*	1.10050	.025	.3711	4.9623

*. The mean difference is significant at the .05 level.